



FUNKČNÍ VZOREK

AEROSOLOVÁ VAKCINACE DRŮBEŽE TRIVALENTNÍ SALMONELOVOU VAKCÍNOU

**doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
Mgr. Marta Matulová, Ph.D.
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.
Mgr. Alena Šebková
MVDr. František Šišák, CSc.
Ing. Hana Havlíčková**

**4057
2015**

Funkční vzorek

4057/2015

AEROSOLOVÁ VAKCINACE DRŮBEŽE TRIVALENTNÍ SALMONELOVOU VAKCÍNOU

Autoři

doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.¹

Mgr. Marta Matulová, Ph.D.¹

MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.¹

Mgr. Alena Šebková¹

MVDr. František Šišák, CSc.¹

Ing. Hana Havlíčková¹

¹ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

ISBN 978-80-86895-78-9

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TA04011004 Technologické agentury ČR a s podporou projektu AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006–ED0006/01/01.

2015

1.	Úvod	3
2.	Cíl metodiky	3
3.	Vlastní popis funkčního vzorku	4
3.1.	Příprava atenuovaných kmenů <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> a <i>S. Infantis</i>	4
3.2.	Imunizace a infekce	4
3.3.	Výsledky	5
4.	Srovnání „novosti postupů“	8
5.	Uplatnění funkčního vzorku	9
6.	Ekonomické aspekty	10
7.	Seznam použité literatury	11
8.	Dedikace	12

1. Úvod

Průmyslová produkce vajec nebo drůbežího masa je založena na vysoké koncentraci kuřat nebo slepic v hejnu. Ačkoli vysoká koncentrace zvířat vede k vysoké produktivitě, na druhé straně je spojena se zvýšeným rizikem šíření infekčních nemocí v hejnech. Šíření chorob neprospívá ani líhnutí kuřat v čistém prostředí líhni, bez kontaktu s rodiči. Kuřata tak nejsou kolonizována baktériemi přirozené střevní mikroflóry a nedochází k přirozené indukci nespecifické imunity. Naopak, pokud se v prostředí vyskytne jakýkoli patogen, trávicí trakt vylíhlé drůbeže pro něj představuje ideální ekologickou niku k rychlému pomnožení a trvalému osídlení.

Nežádoucím důsledkům vysoké koncentrace drůbeže se dá předejít dalším zvyšováním biologického zabezpečení chovů a dodržováním přísných hygienických opatření. Tato opatření jsou však ekonomicky i organizačně poměrně náročná a jejich další, rozšířeně, uplatnění již bude narážet na kompatibilitu s reálným světem. Proto se hledají levnější a účinnější alternativy. Mezi které patří například využití probiotik, vakcinace nebo kombinace obojího. Optimalizované vakcinační schéma vede na jedné straně k vysoké a dlouhodobé chráněnosti chovů drůbeže před infekčními onemocněními, na straně druhé ke snížení prevalence agens v chovech drůbeže a následně i vejcích a drůbežích produktech.

Velký počet kuřat v hejnu vyžaduje nenákladné a rychlé vakcinační techniky, jako je vakcinace pitnou vodou nebo aerosolem. Aerosolový způsob vakcinace je preferován při vakcinaci proti respiračním infekcím, nicméně tento způsob může být účinný i pro vakcinaci proti střevním patogenům (van Eck, 1990). Nespornou výhodou podání vakcíny aerosolovou formou je rychlost, neinvazivita a i skutečnost, že tímto způsobem mohou být vakcinována i čerstvě vylíhnutá kuřata ještě v líhních. V případě vakcinace drůbeže proti salmonelovým infekcím a ve srovnání s orálním podáním vakcín se jako další výhoda jeví homogenní vakcinace všech kuřat a to velmi časně po vylíhnutí. Aerosolově vakcinovaná kuřata proto mohou být chráněna před salmonelovými infekcemi o 2 až 3 dny dříve než při orálním podání, které se reálně provádí až po transportu kuřat z líhni do odchovu, tedy u 3 až 4 denních kuřat.

Z výše uvedených důvodů jsme v našich vakcinačních experimentech testovali orální a aerosolovou vakcinaci jednodenní drůbeže vakcínou, která obsahovala oslabené kmeny 3 různých serovarů salmonel. Dosažené výsledky prokázaly minimálně stejnou účinnost aerosolové vakcinace jako po orální vakcinaci a současně jsme nezaznamenali žádné nežádoucí vedlejší účinky.

2. Cíl metodiky

Hlavním cílem tohoto funkčního vzorku bylo ověřit možnost aerosolové vakcinace drůbeže oslabenou salmonelovou vakcínou obsahující kmeny 3 serovarů a porovnat kvalitu a délku imunitní odpovědi ve srovnání s aplikací stejné vakcíny orální cestou.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

3.1. Příprava atenuovaných kmenů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis*

Experimentální vakcína obsahovala oslabené kmeny serovarů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis*. Oslabení bylo provedeno odstraněním ostrova patogenity SPI1, genu *lon*, a genů pro tvorbu bičíků (*fliC* a *fljB* v závislosti na serovaru). V konečném důsledku tedy byly odstraněny geny SPI1-*fliC-lon* u *S. Enteritidis* (Matulova et al., 2013) a SPI1-*fliC-fljB-lon* u *S. Typhimurium* a *S. Infantis*. Každý ze serovarů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a *S. Infantis* byl ve vakcíně zastoupen ve stejném množství. Všechny mutace byly připraveny pomocí „overlap PCR“, klonováním delečního PCR produktu do plazmidu pDM4 a generování delece v cílovém kmeni dočasnou integrací rekombinantního plazmidu pDM4 do chromozomu hostitele a jeho následnou eliminaci v prostředí s 5% sacharózou spojenou s tvorbou delece (Ho et al., 1989; Milton et al., 1996). Po tomto způsobu delece nezůstávají v modifikovaném bakteriálním kmeni žádné cizorodé sekvence.

3.2. Imunizace a infekce

Experiment byl s drobnými modifikacemi proveden dvakrát.

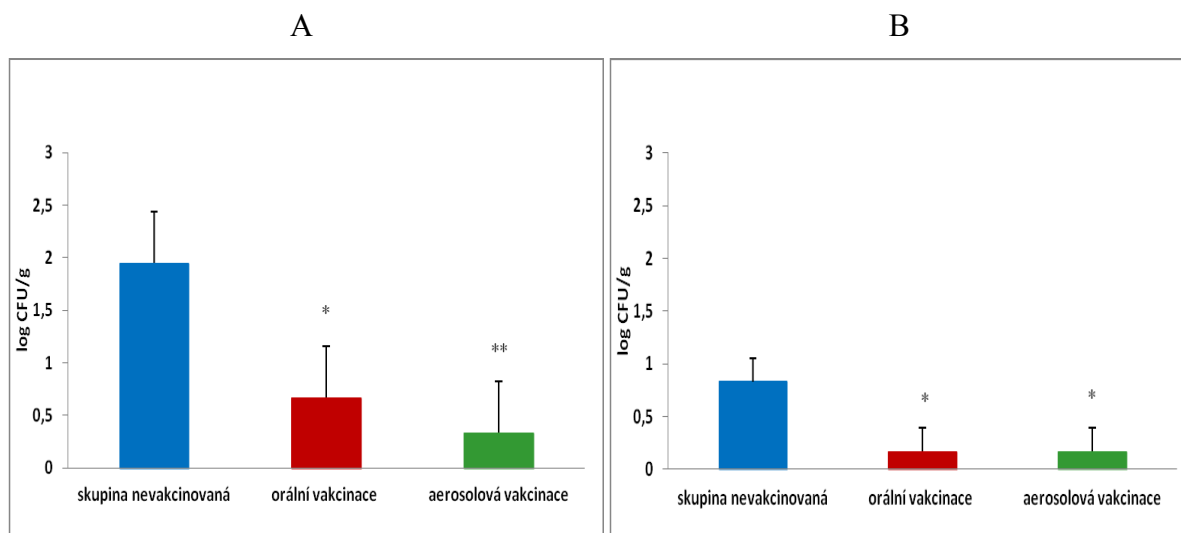
V prvním experimentu bylo v den vylihnutí aerosolově vakcinováno 24 kuřat 10 ml suspenze obsahující 10^7 CFU/ml. Pro srovnání byl stejný počet 24 kuřat vakcinován i orální cestou. Vakcinační dávka obsahovala 10^7 CFU oslabených salmonel v 0,1 ml inokula. Všechna kuřata v obou vakcinovaných skupinách byla orálně revakcinována dávkou 10^7 CFU oslabených kmenů salmonel v 0.1 ml inokula 21. den života. Orální revakcinace u všech kuřat, tedy včetně těch, která byla první den života vakcinována aerosolově, byla použita z pravděpodobných logistických problémů s aerosolovou revakcinací v chovech drůbeže. Poslední skupina se sestávala z 30 nevakcinovaných kontrol. Ve věku 41 dnů bylo 6 nevakcinovaných kontrolních kuřat utraceno. Polovina zbylých kuřat ve všech skupinách byla orálně infikována 10^7 CFU plně virulentního kmene *S. Enteritidis* a u druhé poloviny kuřat byla simulována extrémní infekce s využitím intravenózní infekce v dávce 10^7 CFU virulentního kmene *S. Enteritidis*. Čtyři a čtrnáct dní po infekci bylo 6 kuřat z každé skupiny utraceno a byly stanoveny počty salmonel v játrech a ve slepém střevě.

Ve druhém experimentu bylo pro ověření využito téměř identického uspořádání jen s tím rozdílem, že na počátku bylo v každé skupině 12 kuřat. Tři kuřata z každé skupiny pak byla infikována 41. den života a druhá polovina byla infikována až 84. den života. Kuřata pak byla utracena jen 4 dny po infekci.

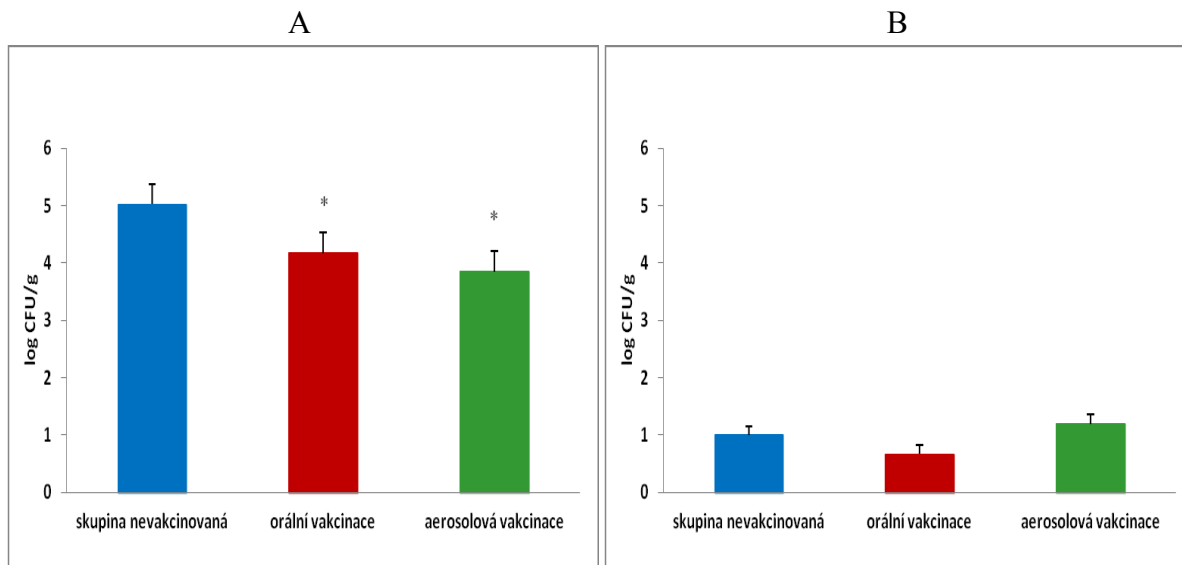
3.3. Výsledky

Orální ale ani aerosolová aplikace vakcíny nevedla k žádným negativním vedlejším účinkům u vakcinovaných kuřat a to ani v jednom z obou pokusů.

Aerosolová imunizace trivalentní vakcínou chránila kuřata 4 i 14 dní po infekci, protože u vakcinovaných kuřat byly statisticky významně nižší počty salmonel v játrech než u kuřat, která nebyla vakcinována (Obr. 1). Chráněnost kuřat byla patrná jak po orální, tak i po intravenózní čelenži. Protože mezi orálně a aerosolově vakcinovanými kuřaty nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly, aerosolová vakcinace poskytovala stejně účinnou ochranu jako orální vakcinace (Obr. 1 a 2).

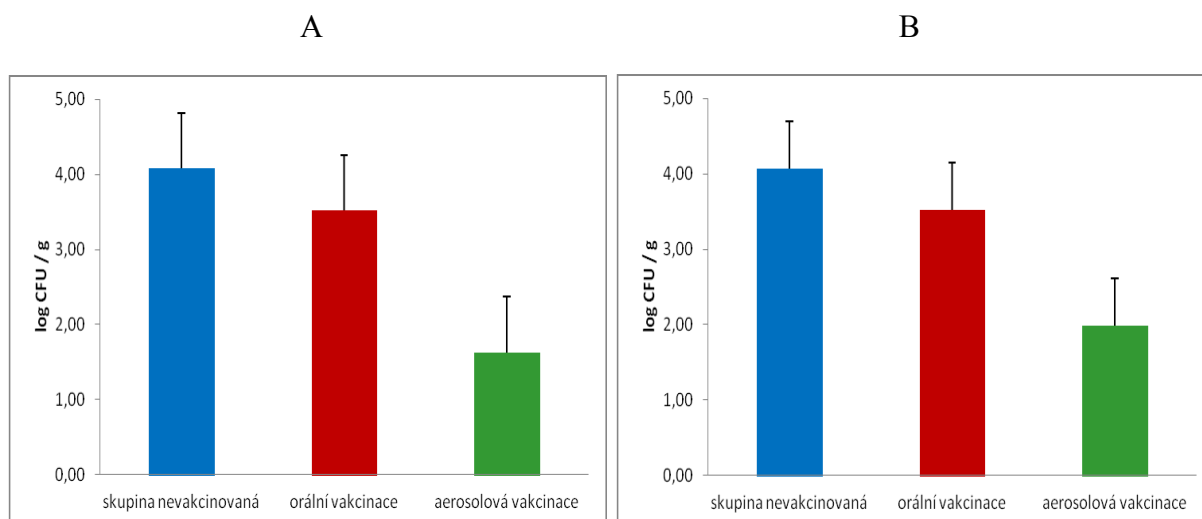


Obr. 1. Ochrana kuřat trivalentní salmonelovou vakcínou aplikovanou orálně a aerosolem před orální infekcí divokým kmenem *S. Enteritidis*. Kuřata byla vakcinována trivalentní vakcínou první den života, 21. den revakcinována a infikována plně virulentním kmenem *S. Enteritidis* 41. den života. Kuřata byla utracena 4 (Panel A) a 14 dní (Panel B) po orální infekci a byly stanoveny počty salmonel v játrech. Modré sloupce - počty salmonel u nevakcinovaných kuřat, červené sloupce - počty salmonel u kuřat vakcinovaných orálně, zelené sloupce - počty salmonel u kuřat vakcinovaných aerosolem. * - signifikantně nižší počet bakterií u vakcinovaných skupin v porovnání s nevakcinovanými a infikovanými kuřaty ($p < 0,05$, ANOVA test), ** - $p < 0,01$, ANOVA test.



Obr. 2. Ochrana kuřat trivalentní salmoneľovou vakcínou aplikovanou orálně a aerosolem před orální infekcí divokým kmenem *S. Enteritidis*. Kuřata byla vakcinována trivalentní vakcínou první den života, 21. den revakcinována a infikována plně virulentním kmenem *S. Enteritidis* 41. den života. Kuřata byla utracena 4 (Panel A) a 14 dní (Panel B) po intravenózní infekci a byly stanoveny počty salmonel v játrech. Modré sloupce - počty salmonel u nevakcinovaných kuřat, červené sloupce - počty salmonel u kuřat vakcinovaných orálně, zelené sloupce - počty salmonel u kuřat vakcinovaných aerosolem. * - signifikantně nižší počet bakterií u vakcinovaných skupin v porovnání s nevakcinovanými a infikovanými kuřaty ($p < 0,05$, ANOVA test).

V opakovaném pokusu jsme po orální čelenži pozorovali jen velmi nízké počty salmonel ve slepém střevě a játrech bez výrazných rozdílů mezi jednotlivými skupinami (nepublikované výsledky). Po intravenózní čelenži jsme pozorovali chráněnost u aerosolově vakcinovaných kuřat, u kterých byly zaznamenány numericky nižší počty salmonel v játrech než u nevakcinovaných kuřat nebo i kuřat vakcinovaných orálně (Obr. 3). Přestože chráněnost nedosahovala statistické významnosti (s největší pravděpodobností pro nízký počet zvířat ve skupině, protože tato vakcinace byla chápána již jen jako verifikační), tak byla zaznamenána jak u šestitýdenních tak i u dvanáctitýdenních kuřat (Obr. 3). Aerosolová vakcinace tedy poskytuje ochranu chovů drůbeže před infekcí salmonelami i u kuřat ve věku 12 týdnů.



Obr. 3. Ochrana kuřat trivalentní salmonelovou vakcínou aplikovanou orálně a aerosolem před orální infekcí divokým kmenem *S. Enteritidis*. Kuřata byla vakcinována trivalentní vakcínou první den života, 21. den revakcinována a infikována plně virulentním kmenem *S. Enteritidis* 41. den (Panel A) nebo 84. den života (Panel B). Kuřata byla utracena 4 dny po intravenózní infekci a byly stanoveny počty salmonel v játrech. Modré sloupce - počty salmonel u nevakcinovaných kuřat, červené sloupce - počty salmonel u kuřat vakcinovaných orálně, zelené sloupce - počty salmonel u kuřat vakcinovaných aerosolem.

4. Srovnání „novosti postupů“

Využití aerosolové vakcinace významně zjednoduší vakcinaci drůbeže a zkrátí dobu od vylíhnutí a vakcinací. To povede k rychlejší, účinnější a plošnější ochraně chovů drůbeže před infekcí divokými kmeny salmonel. Na trhu se žádná podobná vakcína nevyskytuje.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Tento funkční vzor slouží jako základ pro skutečnou živou atenuovanou salmonelovou vakcínu, na které pracujeme ve spolupráci se společností Bioveta a.s. Všechny tři kmeny tvořící vakcínu jsou uloženy na pracovištích autorů i v Biovetě a.s. V současné době je vakcína dále testována podle požadavků lékopisu na schválení živé atenuované salmonelové vakcíny pro orální užití u drůbeže.

6. Ekonomické aspekty

Funkční vzorek je na pracovišti autorů zaveden. Jeho další případné komerční využití závisí na dokončení všech testů požadovaných pro registraci vakcíny. Potenciální ekonomické dopady pro VÚVeL jsou ošetřeny rámcovou smlouvou s možným uživatelem Bioveta a.s.

7. Seznam použité literatury

Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59.

Matulova M, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I (2013) Vaccination of Chickens with SPI1-lon and SPI1-lon-fliC Mutant of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *PLoS One* 8:e66172.

Milton DL, O'Toole R., Horstedt P., Wolf-Watz H (1996) Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* 178, 1310–1319.

van Eck JH. 1990 Vaccination of fowl with inactivated Newcastle disease vaccine by the respiratory route. *Avian Pathol* 19:313-30.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TA04011004 Technologické agentury ČR a s podporou projektu AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006–ED0006/01/01.

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

Hudcova 70, 621 00 Brno

Název: AEROSOLOVÁ VAKCINACE DRŮBEŽE TRIVALENTNÍ SALMONELOVOU VAKCÍNOU

Autoři: doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.

Mgr. Marta Matulová, Ph.D.

MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.

Mgr. Alena Šebková

MVDr. František Šišák, CSc.

Ing. Hana Havlíčková



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz